

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-285693

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)12月16日

C 12 P 21/02  
C 12 N 5/10

H 8214-4B

※

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全 18 頁)

⑯ 発明の名称 ヒト肝実質細胞増殖因子の生産方法および該因子を産生する形質転換体

⑰ 特 願 平2-88592

⑱ 出 願 平2(1990)4月3日

⑲ 発 明 者 喜 多 村 直 実 大阪府守口市八雲東町2丁目272番地

⑲ 発 明 者 仲 大 地 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社  
総合研究所内⑲ 発 明 者 松 井 理 恵 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社  
総合研究所内

⑲ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

⑲ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ヒト肝実質細胞増殖因子の生産方法および該因子  
を産生する形質転換体

## 2. 特許請求の範囲

(1) 下記アミノ酸配列で表わされるヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られる形質転換体を培養してヒト肝実質細胞増殖因子を生産することを特徴とするヒト肝実質細胞増殖因子の生産方法。

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu  
Leu Leu Gln His Val Leu Leu His Leu Leu  
Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu  
Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His  
Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu  
Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys  
Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys  
Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu  
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe AspLys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro  
Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys  
Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu  
Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile  
Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val  
Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln  
Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His  
Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys  
Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro  
Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe  
Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val  
Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu  
Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg  
Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys  
Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro  
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr  
Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys  
Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp  
Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp  
Glu Tyr Cys Ala Tyr Lys Thr Cys Ala Asp

Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu  
 Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly  
 Ile Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile  
 Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp  
 Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr  
 Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg  
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser  
 Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro  
 Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile  
 Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp  
 Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met  
 Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu  
 Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu  
 Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro  
 Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys  
 Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro  
 Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro  
 Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu  
 Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu  
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr

- 3 -

Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro  
 Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser  
 Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly  
 Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu  
 Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp  
 Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile  
 His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys  
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu  
 Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val  
 Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu  
 Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro  
 Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr  
 Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr  
 Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg  
 Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu  
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val  
 Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly  
 Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu  
 Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu  
 Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val

- 4 -

Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro  
 Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala  
 Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile  
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser \*

(2) 下記塩基配列で表わされる、ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られる形質転換体を培養してヒト肝実質細胞増殖因子を生産することを特徴とするヒト肝実質細胞増殖因子の生産方法。

ATG TGG GTG ACC AAA CTC CTG CCA GCC CTG  
 CTG CTG CAG CAT GTC CTC CTG CAT CTC CTC  
 CTG CTC CCC ATC GCC ATC CCC TAT GCA GAG  
 GGA CAA AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT  
 GAA TTC AAA AAA TCA GCA AAG ACT ACC CTA  
 ATC AAA ATA GAT CCA GCA CTG AAG ATA AAA  
 ACC AAA AAA GTG AAT ACT GCA GAC CAA TGT  
 GCT AAT AGA TGT ACT AGG AAT AAA GGA CTT  
 CCA TTC ACT TGC AAG GCT TTT GTT TTT GAT  
 AAA GCA AGA AAA CAA TGC CTC TGG TTC CCC

- 5 -

TTC AAT AGC ATG TCA AGT GGA GTG AAA AAA  
 GAA TTT GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA  
 AAC AAA GAC TAC ATT AGA AAC TGC ATC ATT  
 OGT AAA GGA CGC ACG TAC AAG GGA ACA GTA  
 TCT ATC ACT AAG AGT GGC ATC AAA TGT CAG  
 CCC TGG AGT TCC ATG ATA CCA CAC GAA CAC  
 AGC TTT TTG CCT TCG AGC TAT CGG GGT AAA  
 GAC CTA CAG GAA AAC TAC TGT CGA AAT CCT  
 CGA GGG GAA GAA GGG GGA CCC TGG TGT TTC  
 ACA AGC AAT CCA GAG GTA CGC TAC GAA GTC  
 TGT GAC ATT CCT CAG TGT TCA GAA GTT GAA  
 TGC ATG ACC TGC AAT GGG GAG AGT TAT CGA  
 GGT CTC ATG GAT CAT ACA GAA TCA GGC AAG  
 ATT TGT CAG CGC TGG GAT CAT CAG ACA CCA  
 CAC CGG CAC AAA TTC TTG CCT GAA AGA TAT  
 CCC GAC AAG GGC TTT GAT GAT AAT TAT TGC  
 CGC AAT CCC GAT GGC CAG CCG AGG CCA TGG  
 TGC TAT ACT CTT GAC CCT CAC ACC CGC TGG  
 GAG TAC TGT GCA ATT AAA ACA TGC GGT GAC  
 AAT ACT ATG AAT GAC ACT GAT GTT CCT TTG

- 6 -

GAA ACA ACT GAA TGC ATC CAA GGT CAA GGA  
 GAA GGC TAC AGG GGC ACT GTC AAT ACC ATT  
 TGG AAT GGA ATT CCA TGT CAG CGT TGG GAT  
 TCT CAG TAT CCT CAC GAG CAT GAC ATG ACT  
 CCT GAA AAT TTC AAG TGC AAG GAC CTA CGA  
 GAA AAT TAC TGC CGA AAT CCA GAT GGG TCT  
 GAA TCA CCC TGG TGT TTT ACC ACT GAT CCA  
 AAC ATC CGA GTT GGC TAC TGC TCC CAA ATT  
 CCA AAC TGT GAT ATG TCA CAT GGA CAA GAT  
 TGT TAT CGT GGG AAT GGC AAA AAT TAT ATG  
 GGC AAC TTA TCC CAA ACA AGA TCT GGA CTA  
 ACA TGT TCA ATG TGG GAC AAG AAC ATG GAA  
 GAC TTA CAT CGT CAT ATC TTC TGG GAA CCA  
 GAT GCA AGT AAG CTG AAT GAG AAT TAC TGC  
 CGA AAT CCA GAT GAT GAT GCT CAT GGA CCC  
 TGG TGC TAC ACG GGA AAT CCA CTC ATT CCT  
 TGG GAT TAT TGC CCT ATT TCT CGT TGT GAA  
 GGT GAT ACC ACA CCT ACA ATA GTC AAT TTA  
 GAC CAT CCC GTA ATA TCT TGT GCC AAA ACG  
 AAA CAA TTG CGA GTT GTA AAT GGG ATT CCA

- 7 -

AAT CGT CCT GGT ATT TTT GTC CGA GTA GCA  
 TAT TAT GCA AAA TGG ATA CAC AAA ATT ATT  
 TTA ACA TAT AAG GTA CCA CAG TCA TAG

(3) 下記アミノ酸配列で表わされるヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体に対し、さらに該ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターを用いて繰り返し形質転換し、得られる形質転換体を培養してヒト肝実質細胞増殖因子を生産することを特徴とするヒト肝実質細胞増殖因子の生産方法。

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu  
 Leu Leu Gln His Val Leu Leu His Leu Leu  
 Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu  
 Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His  
 Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu  
 Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys  
 Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys  
 Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu  
 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp

- 9 -

ACA CGA ACA AAC ATA GGA TGG ATG GTT AGT  
 TTG AGA TAC AGA AAT AAA CAT ATC TGC GGA  
 GGA TCA TTG ATA AAG GAG AGT TGG GTT CTT  
 ACT GCA CGA CAG TGT TTC CCT TCT CGA GAC  
 TTG AAA GAT TAT GAA GCT TGG CTT GGA ATT  
 CAT GAT GTC CAC GGA AGA GGA GAT GAG AAA  
 TGC AAA CAG GTT CTC AAT GTT TCC CAG CTG  
 GTA TAT GGC CCT GAA GGA TCA GAT CTG GTT  
 TTA ATG AAG CTT GCC AGG CCT GCT GTC CTG  
 GAT GAT TTT GTT AGT ACG ATT GAT TTA CCT  
 AAT TAT GGA TGC ACA ATT CCT GAA AAG ACC  
 AGT AGC AGT GTT TAT GGC TGG GGC TAC ACT  
 GGA TTG ATC AAC TAT GAT GGC CTA TTA CGA  
 GTG GCA CAT CTC TAT ATA ATG GGA AAT GAG  
 AAA TGC AGC CAG CAT CAT CGA GGG AAG GTG  
 ACT CTG AAT GAG TCT GAA ATA TGT GCT GGG  
 GCT GAA AAG ATT GGA TCA GGA CCA TGT GAG  
 GGG GAT TAT GGT GGC CCA CTT GTT TGT GAG  
 CAA CAT AAA ATG AGA ATG GTT CTT GGT GTC  
 ATT GTT CCT GGT CGT GGA TGT GCC ATT CCA

- 8 -

Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro  
 Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys  
 Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu  
 Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile  
 Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val  
 Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln  
 Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His  
 Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys  
 Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro  
 Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe  
 Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val  
 Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu  
 Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg  
 Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys  
 Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro  
 His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr  
 Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys  
 Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp  
 Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp  
 Glu Tyr Cys Ala Tyr Lys Thr Cys Ala Asp

- 10 -

Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu  
 Glu Thr Thr Glu Cys Ile Glu Gly Gln Gly  
 Ile Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile  
 Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp  
 Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr  
 Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg  
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser  
 Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro  
 Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile  
 Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp  
 Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met  
 Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu  
 Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu  
 Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro  
 Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys  
 Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro  
 Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro  
 Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu  
 Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu  
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr

- 11 -

Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro  
 Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser  
 Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly  
 Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu  
 Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp  
 Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile  
 His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys  
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu  
 Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val  
 Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu  
 Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro  
 Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr  
 Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr  
 Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg  
 Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu  
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val  
 Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly  
 Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu  
 Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu  
 Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val

- 12 -

Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro  
 Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala  
 Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile  
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser \*

(4) 下記アミノ酸配列で表わされるヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターで形質転換して得られるヒト肝実質細胞増殖因子を産生する動物細胞。

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu  
 Leu Leu Gln His Val Leu Leu His Leu Leu  
 Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu  
 Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His  
 Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu  
 Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys  
 Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys  
 Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu  
 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp  
 Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro  
 Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys  
 Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu

- 13 -

Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile  
 Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val  
 Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln  
 Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His  
 Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys  
 Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro  
 Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe  
 Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val  
 Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu  
 Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg  
 Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys  
 Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro  
 His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr  
 Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys  
 Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp  
 Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp  
 Glu Tyr Cys Ala Tyr Lys Thr Cys Ala Asp  
 Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu  
 Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly  
 Ile Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile

- 14 -

Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp  
 Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr  
 Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg  
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser  
 Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro  
 Asn Leu Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile  
 Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp  
 Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met  
 Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu  
 Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu  
 Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro  
 Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys  
 Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro  
 Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro  
 Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu  
 Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu  
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr  
 Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro  
 Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser  
 Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly

- 15 -

Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu  
 Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp  
 Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile  
 His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys  
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu  
 Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val  
 Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu  
 Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro  
 Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr  
 Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr  
 Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg  
 Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu  
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val  
 Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly  
 Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu  
 Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu  
 Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val  
 Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro  
 Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala  
 Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile

- 16 -

Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser \*

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は少なくとも蛋白質発現に必要なプロモーター配列、シグナルペプチド様配列、ヒト肝実質細胞増殖因子をコードするDNA配列及びターミネーター配列を有する発現ベクターにより形質転換された形質転換体、さらにその形質転換体を培養することによりかかるヒト肝実質細胞増殖因子を産生する方法に関する。

(従来の技術)

肝臓は、生体中唯一再生可能な臓器である。この肝再生現象は肝移植実験や体液交流実験などから何らかの液性因子によることが示唆されてきた。近年、本発明者らは肝実質細胞を生体内より取り出し生体外においてその増殖を促進させるヒト由来の蛋白性因子すなわち、ヒト肝実質細胞増殖因子(以下「hHGF」と略す。)を劇症肝炎患者血漿より見いだし(バイオメディカルリサーチ(Biomed. Res.) 6巻 231頁(1985)及びエクスプレ

- 17 -

メンタルセルリサーチ(Exp. Cell. Res.) 166巻 139頁(1986))、世界で初めて単一の蛋白質として精製することに成功した(特開昭63-22526号公報及びジャーナルオブクリニカルインベスティゲーション(J. Clin. Invest.) 81巻 414頁(1988))。さらにhHGF蛋白質をコードする遺伝子を単離するに至った(特許出願済(特願平1-209449号)及びバイオケミカルバイオフィジカルリサーチコミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Comun.) 163巻 967頁(1989))。

このhHGF蛋白質はシグナル様ペプチド配列から数え、494個のアミノ酸からなるH鎖ペプチドと234個のアミノ酸からなるL鎖ペプチドより構成される蛋白質で少なくとも4箇所に糖鎖結合部位を持つことを特徴とする。これら2つのペプチド鎖はジスルフィド結合(S-S結合)により結合しており、肝実質細胞の増殖を生体外に於いて促進する活性が認められている(バイオケミカルバイオフィジカルリサーチコミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Comun.) 163巻 967頁(1989))。各ペプチド鎖

- 18 -

の遺伝子は H 鎖及び L 鎖ペプチドの順に連なった形でコードされている。そのため一本の RNA 上に転写され、同時に一つの蛋白質として翻訳される。その後 N 末端側に存在するシグナル様配列の切断除去が起こりさらにそれ以降の一本の蛋白質鎖が二本に切断される。これによって生じた二本のペプチド鎖は S-S 結合を介して機能的な蛋白質を形成すると考えられる。

(発明が解決しようとする問題点)

この hHGF 蛋白質の生化学的ならびに生理的機能を明らかにすることは肝再生機構の解明のみならず、生体外における安定な肝実質細胞の供給ならびに肝疾患に対する治療薬の開発に重要な役割を担ってくる。しかしながら hHGF 蛋白質の生体における詳細な機能、あるいは肝障害時における肝再生に対する hHGF 蛋白質の効果等を調べるためには多量の hHGF 蛋白質を必要とする。

ところが現在に至るまで hHGF 蛋白質を取得する方法としては、劇症肝炎患者血漿を材料として、その中に微量に存在する hHGF 蛋白質の精製

を行わざるをえなかった。この方法は人的、時間的、價格的に必ずしも容易な方法ではなく、またウイルスなどを始めとした感染源の存在する患者血漿中から微量な hHGF 蛋白質のみを安定にとり出すことは困難を極める。これらの理由から劇症肝炎患者血漿を材料とした hHGF 蛋白質の安定かつ大量の精製は行われていなかった。

(問題点を解決するための手段)

そこで本発明者らは、hHGF 蛋白質を組換え DNA 技術により安定かつ大量に取得するため種々の検討をした結果、この目的に有用な hHGF 蛋白質をコードする遺伝子を含む発現ベクターを新たに構築し hHGF 蛋白質の発現を可能にした。

即ち、本発明の要旨は、第 2 図で表わされる hHGF 遺伝子を有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られる形質転換体を培養して hHGF を生産することを特徴とする hHGF の生産方法および該因子を産生する形質転換体に存する。

以下に、本発明を説明する。

hHGF 蛋白質の工業生産のためには、その蛋白質

発現が安定した宿主-ベクター系を選択すること、さらに発現した hHGF 蛋白質が生物学的活性すなわち肝実質細胞の増殖活性を有している必要がある。特に天然の hHGF 蛋白質が糖蛋白質であること、また hHGF 蛋白質が多くのシステイン残基を含み、そのシステイン残基間のチオール結合の位置および蛋白質の高次構造が活性維持に重要であることを考慮する必要がある。

このような場合、宿主としては酵母や大腸菌例えば、*Saccharomyces cerevisiae* 株や *Escherichia coli* YA-21 株等の微生物も使用することが出来るが、動物細胞例えば CHO 細胞、COS 細胞、マウス L 細胞、マウス C127 細胞、マウス FM3A 細胞等を用いて上記遺伝子を発現させることが望ましい。またこれらの細胞を宿主とする場合は、第 1 図に示す DNA 配列中に含まれるシグナル様配列すなわち 1 から 87 番目、1 から 93 番目を含む未成熟の hHGF 遺伝子を細胞内に導入することにより、成熟型 hHGF 蛋白質が細胞外に分泌生産されることが期待されるという利点が挙げられる。

本発明において用いられる発現ベクターは、そのプロモーター下流に hHGF 蛋白質の一部または全部のアミノ酸配列をコードする DNA 断片を有する。

プロモーターとしては、種々のプロモーターが報告されているが、本発明においては、SV40 プロモーターまたはメタロチオネイン遺伝子のプロモーターが好ましい。このプロモーターの下流に前述のシグナル様配列を含む未成熟の hHGF 遺伝子の DNA 断片を転写方向に従って挿入する。この場合、hHGF 遺伝子の DNA 断片を 2-3 個結合したものを挿入してもよいし、また、hHGF 遺伝子の DNA 断片の 5' 上流側にプロモーターを結合した DNA 断片を単位とし、転写方向を揃えて 2-3 個結合したものを挿入してもよい。

上記 hHGF 遺伝子には、その下流にポリアデニル化部位が存在することが必要である。例えば、SV40DNA、 $\beta$ -グロビン遺伝子またはメタロチオネイン遺伝子由来のポリアデニル化部位が hHGF 遺伝子の下流に 1 つ存在することが必要である。ま

た、hHGF遺伝子にプロモーターを結合したDNA断片を2-3個タンデムに挿入する方法を用いた場合には、各hHGF遺伝子の3'側にそれぞれポリアダニル化部位を存在させることが可能である。

上記の発現ベクターを用いて動物細胞例えばCHO細胞を形質転換する際には、選択マーカーを用いることが望ましい。選択マーカー遺伝子を該発現ベクターのポリアダニル化部位下流に順方向あるいは逆方向に挿入しておく、形質転換体を得る際に、選択マーカー遺伝子を含む別のプラスミドを二重形質転換する必要がない。このような選択マーカーとしては、メトトレキセート耐性を与えるDHFR遺伝子(ジャーナルオブモレキュラバイオロジー(J. Mol. Biol.)159巻601頁(1982))、抗生物質G-418耐性を与えるNeo遺伝子(ジャーナルオブモレキュラアブライドジェネティクス(J. Mol. Appl. Genet.)1巻327頁(1982))、ミコフェノール酸耐性を与える大腸菌由来のEcogpt遺伝子(プロシーディングアンドナショナルアカデミーオブサイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)78巻

2072頁(1981))、抗生物質ハイグロマイシン耐性を与えるhph遺伝子(モレキュラセルバイオロジー(Mol. Cell. Biol.)5巻410頁(1985))等が挙げられる。これらの各耐性遺伝子の5'上流側にはプロモーター、例えば前述のSV40由来のプロモーターが挿入されており、また、各耐性遺伝子の3'下流側には、前述のポリアダニル化部位が含まれる。

発現ベクターに上記のような選択マーカー遺伝子が挿入されていない場合には、形質転換体の選択のマーカーを有するベクター例えばpSV2neo(ジャーナルオブモレキュラアブライドジェネティクス(J. Mol. Appl. Genet.)1巻327頁(1982))、pMBG(ネイチャー(Nature)294巻228頁(1981))、pSV2gpt(プロシーディングアンドナショナルアカデミーオブサイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)78巻2072頁(1981))、pAd-D26-1(ジャーナルオブモレキュラバイオロジー(J. Mol. Biol.)159巻601頁(1982))(J. Mol. Biol. 159, 601(1982))などをhHGF遺伝子の発現ベクターと共に二重形質転換し、選択マーカー遺伝子の表現形質により形質

- 23 -

転換体を容易に選択できる。

以上のような方法で、選択されるhHGF蛋白質遺伝子を含む細胞について選択マーカーを変更して二重形質転換を繰り返すことは、約20倍程度発現量を上昇させ得るので好ましい。

発現ベクターの動物細胞への導入はリン酸カルシウム法(ビルオロジー(Virology)52巻456頁(1973))、エレクトロポレーション法(ジャーナルオブメンブレンバイオロジー(J. Membr. Biol.)10巻279頁(1972))等が挙げられるが、リン酸カルシウム法が一般的である。

形質転換された動物細胞の培養は、常法により浮遊培養または付着培養で行うことができる。培地としては、MEM、RPMI1640などを用い、5-10%血清存在下もしくは適量のインシュリン、デキサメサゾン、トランスフェリンの存在下、もしくは無血清下にて培養する。

hHGF蛋白質を産生している動物細胞はその培養上清中に産生されたhHGF蛋白質を分泌することから、この組換え体の培養上清を用いhHGF蛋白

質の分離精製を行うことが可能である。具体的には生産されたhHGF蛋白質を含む培養上清を各種クロマトグラフィー、例えば、S-セファロース、ヘパリンセファロース、ハイドロキシアパタイトもしくは硫酸化セルロファイン等を組み合わせたクロマトグラフィーにて精製することにより、hHGF蛋白質を単離精製することができる。

#### (実施例)

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、その要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### [I] hHGF蛋白質発現プラスミドの調製

第3図にhHGF蛋白質発現プラスミドの調製方法を示す。hHGFcDNA(バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(B.B.R.C)第163巻(2)967頁-973頁(1989))を含むBamHI-KpnI断片すなわちhHGF蛋白質翻訳開始点ATGより27塩基上流のBamHI切断点から終止コドンTAGより8塩基上流のKpnI切断点まで

- 25 -

- 26 -

の領域をカバーする約2.3kbの Bam HI-Kpn I 断片を含むプラスミド pUCHGF1DNA を常法(「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、93頁(1982))により調製した。

次に該プラスミド DNA 10 $\mu$ g を常法に従い制限酵素 Kpn I で切断し、得られた DNA 断片を常法に従いフェノール・クロロホルム抽出を行い、エタノール沈澱により該 DNA 断片を精製し 10 $\mu$ l の水に溶解した。

さらにこの DNA 断片の Kpn I 切断点に第3図に示す両末端が制限酵素 Kpn I 切断点をもちかつ内部に終止コドン TGA 及び制限酵素 Bam HI 切断点を含む 32塩基の合成リンカーを Maniatis らの方法(「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、396頁-397頁(1982))に従い導入した。

これを用いて常法に従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体よりプラスミド DNA を常法(「モレキュラー・クローニング」、コールド・ス

プリング・ハーバー・ラボラトリー、93頁(1982))により調製した。

次に該プラスミド DNA 10 $\mu$ g を常法に従い制限酵素 Bam HI で切断し、この制限酵素反応液を 1.0% アガロースゲルによって電気泳動をすることにより目的の開始コドン ATG と終止コドン TGA を含む hHGFcDNA 断片をベクター等の目的以外の DNA 断片と分離した。Maniatis らの方法(「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、164頁(1982))に従いアガロースゲル断片から目的とする hHGF 遺伝子をコードする約 2.3 kb の Bam HI-Bam HI DNA 断片を調製した。得られた DNA 断片の末端を常法に従い T4DNA ポリメラーゼにて平滑末端にした後フェノール・クロロホルム抽出を行い、エタノール沈澱により該 DNA 断片を精製し 10 $\mu$ l の水に溶解した。

一方、発現ベクター pKCR(プロシーディング・アンド・ナチュラル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Nat. Acad. Sci.) 78巻 1527頁(1981)) 0.05  $\mu$ g

- 27 -

は予め常法に従い平滑末端を生じる制限酵素 Sma I で切断し、フェノール・クロロホルム抽出を行いエタノール沈澱により精製した。これを 400 $\mu$ l の 50 mM トリス-塩酸(pH 8)、1 mM 塩化マグネシウム溶液に溶解したのちバクテリアルアルカリホスファターゼ(東洋紡、BAP-101) I ユニットを添加し、65°C 下 30 分の反応を施し脱燐酸化処理を行った。次にこの反応液からフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈澱により該 DNA 断片を精製し 10 $\mu$ l の水に溶解した。

上記の様に調製した pKCR ベクターの DNA 断片 0.01  $\mu$ g と前述の平滑末端化された hHGFcDNA の Bam HI 断片 0.1  $\mu$ g を含む反応液(66 mM トリス-塩酸 pH 7.6、6.6 mM 塩化マグネシウム 10 mM ジチオスレイトール、66  $\mu$  M ATP) 20 $\mu$ l 中にて 14°C で 12 時間 T4DNA リガーゼ(東洋紡 LGA-101)による結合反応を行った。この T4DNA リガーゼ反応液 10 $\mu$ l を用いて大腸菌 HB 101 株(宝酒造)を説明書に従い形質転換し、アンピシリンを 50  $\mu$ g/ml の濃度で含む培地上で培養することにより数十個のア

ンピシリン耐性株を得た。

これらの組換え体を Maniatis らの方法(「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、86頁~96頁(1982))に従い解析することにより、発現ベクター pKCR のプロモーターとポリアダニレーション部位の間に存在する制限酵素 Sma I 切断部位に hHGF 遺伝子が順方向に二連結したプラスミド、pKCRHGF-2 プラスミドを得ることが出来た。

その構造を第4図に示す。

[II] hHGF 蛋白質を継代的に発現する細胞株の取得

実施例 1-[I] により作製された発現ベクター pKCR(プロシーディング・アンド・ナチュラル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Nat. Acad. Sci.) 78巻(2) 1527頁(1981))の制限酵素 Bam HI 切断部位に hHGFcDNA が二個挿入されたプラスミド pKCRHGF-2 を Maniatis らの方法(「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、86頁~96頁(1982))に従い組換え

- 29 -

- 30 -



体の大腸菌から回収、精製し HGF 発現プラスミド DNA を大量に得た。

一方形質転換細胞選択用のマーカーをコードするプラスミド pSV2neo (ジャーナル・オブ・アプライド・ジェネティクス (Journal of Applied Genetics) 1 巻 327 頁 (1982)) を有する組換え体の大腸菌および pAd-D26-1 (ジャーナル・オブ・モレキュラ・バイオロジー (Journal of molecular biology) 第 159 巻 601 頁 (1982)) を有する組換え体の大腸菌から前述の Maniatis らの方法に従い該プラスミド DNA を回収、精製した。

得られた三種のプラスミド DNA を用いて Ausubel らの方法 (カレント・プロトコール・イン・モレキュラ・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), グリーン・パブリッシング・アソシエイツ・アンド・ウイリー・インターサイエンス (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience) 9・1・1 章 ~ 9・1・4 章 (1987)) を基に CHO 細胞に二重形質転換して CHO 細胞を形質転換した。

- 31 -

けて室温で 30 分間静置した。その後 FCS が 10% 入った ERDF 培地 9 ml をシャーレに入れて、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で 4~5 時間培養した。次にシャーレから培地を除き 5 ml の 1×TBS++ 溶液 (1×TBS++ 溶液; 25 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、140 mM 塩化ナトリウム、5 mM 塩化カリウム、0.6 mM 燐酸水素二ナトリウム、0.08 mM 塩化カルシウム、0.08 mM 塩化マグネシウム) で細胞を洗浄し、1×TBS++ 溶液を除去した後、グリセロールを 20% 含む 1×TBS++ 溶液 5 ml を、細胞にかけて、室温で 1~2 分間静置し、上清を除去した。その後 5 ml の 1×TBS++ 溶液で細胞を再び洗浄し、FCS が 10% 入った ERDF 培地 10 ml をシャーレに入れて 5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で培養した。培養後、48 時間が経過した時点で培地を除き、5 ml の 1×TBS++ 溶液で細胞を洗浄した後、細胞にトリプシン-EDTA 溶液 (シグマ社) 2 ml をかけ、室温で 30 秒静置した。その後、トリプシン-EDTA 溶液を除き、それから 5 分後に FCS が 10% 入った ERDF 培地 10 ml をシャーレに入れて細胞を剥が

- 33 -

即ち、まず直径 9 cm のシャーレの中で FCS (牛胎児血清) が 10% 入った ERDF 培地 (旭東製薬社製) 中で CHO 細胞をセミコンフルエントな状態になるまで培養した。次にシャーレから培地を除きそこに DNA 溶液を滴加するが、該 DNA 溶液は予め次に示す手順に従って調製した。

まず直径 9 cm のシャーレー一枚につき 300  $\mu$ l の 2×HEBS 溶液 (2×HEBS 溶液; 1.6% 塩化ナトリウム、0.074% 塩化カリウム、0.05% 燐酸水素二ナトリウム 12 水塩、0.2% デキストロース、1% HEPES (pH 7.05)) と 10  $\mu$ g のプラスミド DNA および 1  $\mu$ g の pSV2neo プラスミド DNA、1  $\mu$ g の pAd-D26-1 プラスミド DNA を加え、滅菌された水で 570  $\mu$ l に合わせた溶液をエッペンドルフ遠心管中に準備する。次に該 DNA 溶液に 30  $\mu$ l の 2.5 M の塩化カルシウム溶液を滴加しながらボルテックスミキサーを用い数秒間激しく混和する。これを室温で 30 分間放置するが、その間およそ 10 分おきにボルテックスミキサーで混和する。

この様にしてできた DNA 溶液を前述の細胞にか

- 32 -

し、9 cm シャーレー一枚分の細胞を 9 cm シャーレ 10 枚に分けて薬剤 G418 (G418 硫酸塩 (GENETICIN); GIBCO 社) を 200  $\mu$ g/ml の濃度になるように加えて培養を続けた。その後 10 日が経過した時点で生き残った G418 に耐性の細胞を単離し、一つの培養用の穴がおよそ 3.1 cm<sup>2</sup> の 24 穴の培養皿を用い、それぞれ FCS が 10% 入った ERDF 培地 1 ml 中でおよそ 7 日間培養し直した。

以上の細胞の培地を FCS を含まない ERDF 培地に代えて培養を続け 72 時間が経過した細胞の培地を個別に 2 ml 集め、それをセントリコン濃縮器 (ミリポア社) で 50  $\mu$ l に遠心濃縮してそのうちの約 15  $\mu$ l をサンプルとして、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

これを常法に従いウエスタンブロット法で解析し hHGF 蛋白質の発現を確認した。

また、Gohda らの方法 (エクスペリメンタル・セル・リサーチ (Experimental Cell Research) 166 巻 139 頁 ~ 150 頁 (1986)) により hHGF 活性を測定し生物学的活性の存在を確認した。

- 34 -

さらに得られた細胞株は個別に単離され酵素イムノアッセイ法を行いhHGF蛋白質の定量を行った。

その結果、発現量の確認された細胞株B-1, B-27, B-102を得た。

#### 実施例 2

[I] hHGF遺伝子を有する発現ベクターを用いて繰り返し形質転換して得られる、hHGF蛋白質を継代的に発現する細胞株の取得

実施例1-[I]により取得した、hHGF遺伝子発現ベクターpKCRHGF-2及びミコフェノール酸耐性の形質転換細胞選択用のマーカーをコードするプラスミドpMBG(Nature 294, 228(1981))を有する組換え体の大腸菌から、前述のManiatisらの方法に従い該プラスミドDNAを回収、精製した。

得られた二種のプラスミドDNAを用いてAusubelらの方法(カレント・プロトコール・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology)、グリーン・パブリッシング・アソシエーツ・アンド・ウイリー・インターサイエンス

(Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)9・1・1章〜9・1・4章(1987))を基に、実施例1-[II]によって得られたhHGF蛋白質を継代的に発現する細胞株のうち、hHGFの発現量の多いものの3株(B-1, B-27, B-102)を単離し、それらを個別に二重形質転換して該細胞を形質転換した。

すなわち、まず直径9cmシャーレの中でFCSが10%入ったERDF培地中で、前述のhHGF蛋白質を継代的に発現する細胞株を個別にセミコンフルエントな状態になるまで培養した。次にシャーレから培地を除きそこにDNA溶液を滴加するが、該DNA溶液は、10 $\mu$ gのpKCRHGF-2プラスミドDNA及び1 $\mu$ gのpMBGプラスミドDNAを用いる以外は、実施例1-[II]と同様の手順で調製した。

この様にしてできたDNA溶液を前述の細胞にかけて室温で30分間静置した。その後FCSが10%入ったERDF培地9mlをシャーレに入れて、5%CO<sub>2</sub>存在下、37°Cで4〜5時間培養した。次にシャーレから培地を除き5mlの1×TBS++溶液(前述)で細胞を洗浄し、1×TBS++溶液を除去し

- 35 -

た後、グリセロールを20%含む1×TBS++溶液5mlを細胞にかけて、室温で1〜2分間静置し、上清を除去した。その後5mlの1×TBS++溶液で細胞を再び洗浄し、FCSが10%入ったERDF培地10mlをシャーレに入れて5%CO<sub>2</sub>存在下、37°Cで培養し、48時間が経過した時点で培地を除き、5mlの1×TBS++溶液で細胞を洗浄した後、細胞にトリプシン-EDTA溶液(シグマ社)2mlをかけ、室温で30秒静置した。その後、トリプシン-EDTA溶液を除き、それから5分後にFCSが10%入った $\alpha$ -MEM(-)培地10mlをシャーレに入れて細胞を剥がし、9cmシャーレー一枚の細胞を9cmシャーレ10枚に分けて薬剤ミコフェノール酸(シグマ社製)を1 $\mu$ g/ml及びキサンチン(シグマ社製)を250 $\mu$ g/mlの濃度になるように加えて培養を続けた。その後10日が経過した時点で生き残ったミコフェノール酸に耐性の細胞を単離し、一つの培養用の穴がおおよそ3.1cm<sup>2</sup>の24穴の培養皿を用い、それぞれFCSが10%入ったERDF培地1ml中でおおよそ7日間培養し直した。

- 37 -

以上の細胞の培地をFCSを含まないERDF培地に代えて培養を続け72時間が経過した細胞の培地を個別に2ml集め、それらをセントリコン濃縮器(ミリポア社)で50 $\mu$ lに遠心濃縮してそのうち約15 $\mu$ lをサンプルとしてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

これを常法に従いウエスタンブロット法で解析しhHGF蛋白質の発現を確認した。

また、Gohdaらの方法(エクスペリメンタル・セル・リサーチ(Experimental Cell Research)166巻139頁〜150頁(1986))によりhHGF活性を測定し生物学的活性の存在を確認した。

その結果を第5図に示す。

さらに、得られた細胞株のうちいくつかを個別に単離し酵素イムノアッセイ法でhHGF蛋白質の発現量を確認した結果、二重形質転換前の細胞株B-102の発現量のおおよそ20倍の発現量を示す細胞株BD-24を得た。

(発明の効果)

本発明に係るhHGF遺伝子を挿入された発現

- 38 -

ベクターを宿主細胞に導入することにより、今まで困難であった生物学的活性を有する hHGF 蛋白質を大量、安定かつ容易に生産することが可能となる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図はヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子の塩基配列を表わす。

第2図はヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子から推定されるアミノ酸配列を示す。

第3図は、ヒト肝実質細胞増殖因子を発現するベクターを構築する工程を表わす。

第4図は、本発明のヒト肝実質細胞増殖因子をコードする DNA を有する発現ベクターの構造を表わす。

第5図は、本発明のヒト肝実質細胞増殖因子をコードする DNA を有する発現ベクターを有する CHO 細胞が産生するヒト肝実質細胞増殖因子を含む培養上清の生物学的活性を示したものである。

第 1 図 (続)

ATG TGG GTG ACC AAA CTC CTG CCA GCC CTG CTG CAG CAT GTC CTC CTG CAT CTC CTC<sup>60</sup>  
<sup>Pst I</sup>  
 CTG CTC CCC ATC GCC ATC CCC TAT GCA GAG GGA CAA AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT<sup>120</sup>  
 GAA TTC AAA AAA TCA GCA AAG ACT ACC CTA ATC AAA ATA GAT CCA GCA CTG AAG ATA AAA<sup>180</sup>  
<sup>Eco RI</sup>  
 ACC AAA AAA GTG AAT ACT GCA GAC CAA TGT GCT AAT AGA TGT ACT AGG AAT AAA GGA CTT<sup>240</sup>  
<sup>Pst I</sup>  
 CCA TTC ACT TGC AAG GCT TTT GTT TTT GAT AAA GCA AGA AAA CAA TGC CTC TGG TTC CCC<sup>300</sup>  
 TTC AAT AGC ATG TCA AGT GGA GTG AAA AAA GAA TTT GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA<sup>360</sup>  
 AAC AAA GAC TAC ATT AGA AAC TGC ATC ATT GGT AAA GGA CGC AGC TAC AAG GGA ACA GTA<sup>420</sup>  
 TCT ATC ACT AAG AGT GGC ATC AAA TGT CAG CCC TGG AGT TCC ATG ATA CCA CAC GAA CAC<sup>480</sup>  
 AGC TTT TTG CCT TCG AGC TAT CGG GGT AAA GAC CTA CAG GAA AAC TAC TGT CGA AAT CCT<sup>540</sup>  
<sup>Xho I</sup>  
 CGA GGG GAA GAA GGG GGA CCC TGG TGT TTC ACA AGC AAT CCA GAG GTA CGC TAC GAA GTC<sup>600</sup>  
 TGT GAC ATT CCT CAG TGT TCA GAA GTT GAA TGC ATG ACC TGC AAT GGG GAG AGT TAT CGA<sup>660</sup>  
 GGT CTC ATG GAT CAT ACA GAA TCA GGC AAG ATT TGT CAG CGC TGG GAT CAT CAG ACA CCA<sup>720</sup>  
 CAC CGG CAC AAA TTC TTG CCT GAA AGA TAT CCC GAC AAG GGC TTT GAT GAT AAT TAT TGC<sup>780</sup>

第1図(その2)

CGC	AAT	CCC	GAT	GGC	CAG	CCG	AGG	CCA	TGG	TGC	TAT	ACT	CTT	GAC	CCT	CAC	ACC	CGC	TGG	840
								Nco I												
GAG	TAC	TGT	GCA	ATT	AAA	ACA	TGC	GCT	GAC	AAT	ACT	ATG	AAT	GAC	ACT	GAT	GTT	CCT	TTG	900
		Scal																		
GAA	ACA	ACT	GAA	TGC	ATC	CAA	GGT	CAA	GGA	GAA	GGC	TAC	AGG	GGC	ACT	GTC	AAT	ACC	ATT	960
TGG	AAT	GGA	ATT	CCA	TGT	CAG	CGT	TGG	GAT	TCT	CAG	TAT	CCT	CAC	GAG	CAT	GAC	ATG	ACT	1020
			Eco RI																	
CCT	GAA	AAT	TTC	AAG	TGC	AAG	GAC	CTA	CGA	GAA	AAT	TAC	TGC	CGA	AAT	CCA	GAT	GGG	TCT	1080
GAA	TCA	CCC	TGG	TGT	TTT	ACC	ACT	GAT	CCA	AAC	ATC	CGA	GTT	GGC	TAC	TGC	TCC	CAA	ATT	1140
CCA	AAC	TGT	GAT	ATG	TCA	CAT	GGA	CAA	GAT	TGT	TAT	CGT	GGG	AAT	GGC	AAA	AAT	TAT	ATG	1200
GGC	AAC	TTA	TCC	CAA	ACA	AGA	TCT	GGA	CTA	ACA	TGT	TCA	ATG	TGG	GAC	AAG	AAC	ATG	GAA	1260
GAC	TTA	CAT	CGT	CAT	ATC	TTC	TGG	GAA	CCA	GAT	GCA	AGT	AAG	CTG	AAT	GAG	AAT	TAC	TGC	1320
CGA	AAT	CCA	GAT	GAT	GAT	GCT	CAT	GGA	CCC	TGG	TGC	TAC	ACG	GGA	AAT	CCA	CTC	ATT	CCT	1380
TGG	GAT	TAT	TGC	CCT	ATT	TCT	CGT	TGT	GAA	GGT	GAT	ACC	ACA	CCT	ACA	ATA	GTC	AAI	TTA	1440
GAC	CAT	CCC	GTA	ATA	TCT	TGT	GCC	AAA	ACG	AAA	CAA	TTG	CGA	GTT	GTA	AAT	GGG	ATT	CCA	1500
ACA	CGA	ACA	AAC	ATA	GGA	TGG	ATG	GTT	AGT	TTG	AGA	TAC	AGA	AAT	AAA	CAT	ATC	TGC	GGA	1560
GGA	TCA	TTG	ATA	AAG	GAG	AGT	TGG	GTT	CTT	ACT	GCA	CGA	CAG	TGT	TTC	CCT	TCT	CGA	GAC	1620
																	Xho I			

## 第 1 図 (103)

```

TTG AAA GAT TAT GAA GCT TGG CTT GGA ATT CAT GAT GTC CAC GGA AGA GGA GAT GAG AAA 1680
      Eco RI
TGC AAA CAG GTT CTC AAT GTT TCC CAG CTG GTA TAT GGC CCT GAA GGA TCA GAT CTG GTT 1740
TTA ATG AAG CTT GCC AGG CCT GCT GTC CTG GAT GAT TTT GTT AGT ACG ATT GAT TTA CCT 1800
AAT TAT GGA TGC ACA ATT CCT GAA AAG ACC AGT TGC AGT GTT TAT GGC TGG GGC TAC ACT 1860
GGA TTG ATC AAC TAT GAT GGC CTA TTA CGA GTG GCA CAT CTC TAT ATA ATG GGA AAT GAG 1920
AAA TGC AGC CAG CAT CAT CGA GGG AAG GTG ACT CTG AAT GAG TCT GAA ATA TGT GCT GGG 1980
GCT GAA AAG ATT GGA TCA GGA CCA TGT GAG GGG GAT TAT GGT GGC CCA CTT GTT TGT GAG 2040
CAA CAT AAA ATG AGA ATG GTT CTT GGT GTC ATT GTT CCT GGT CGT GGA TGT GCC ATT CCA 2100
AAT CGT CCT GGT ATT TTT GTC CGA GTA GCA TAT TAT GCA AAA TGG ATA CAC AAA ATT ATT 2160
TTA ACA TAT AAG GTA CCA CAG TCA TAG
      Kpn I

```

第 2 図 (その2)

Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val  
Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu  
Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg  
Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys  
Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro  
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr  
Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys  
Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp  
Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp  
Glu Tyr Cys Ala Tyr Lys Thr Cys Ala Asp  
Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu  
Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly  
Ile Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile  
Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp  
Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr  
Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg  
Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser  
Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro  
Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile

第 2 図 (その1)

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu  
Leu Leu Gln His Val Leu Leu His Leu Leu  
Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu  
Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His  
Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu  
Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys  
Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys  
Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu  
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp  
Lys Ala Arg Lys Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro  
Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys  
Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu  
Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile  
Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val  
Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln  
Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His  
Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys  
Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro  
Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe

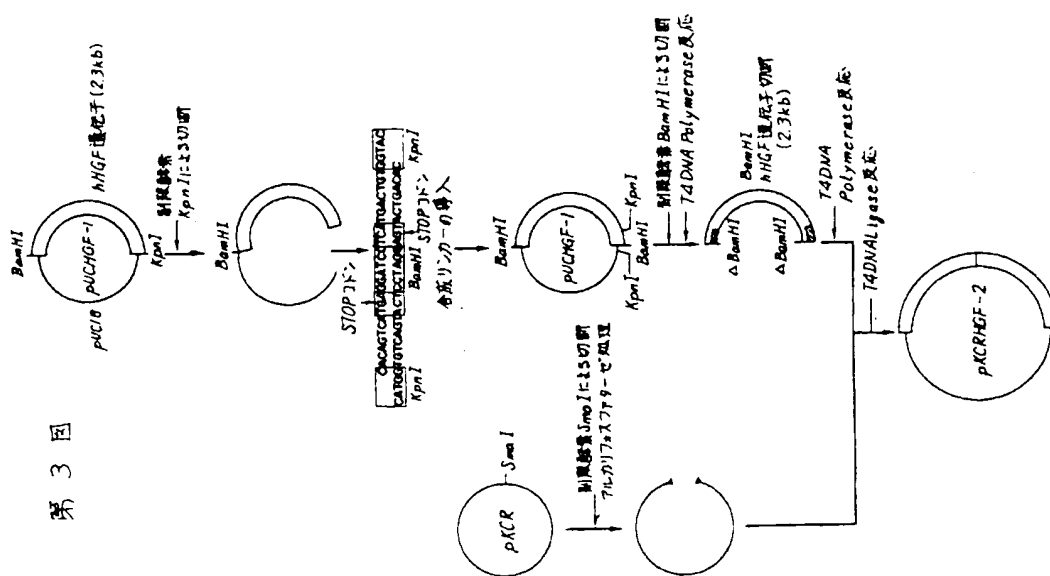
## 第 2 図 (その3)

Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp  
 Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met  
 Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu  
 Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu  
 Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro  
 Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys  
 Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro  
 Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro  
 Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu  
 Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu  
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr  
 Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro  
 Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser  
 Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly  
 Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu  
 Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp  
 Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile  
 His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys  
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu

## 第 2 図 (その4)

Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val  
 Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu  
 Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro  
 Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr  
 Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr  
 Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg  
 Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu  
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val  
 Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly  
 Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu  
 Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu  
 Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val  
 Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro  
 Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala  
 Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile  
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser \*





第 4 図

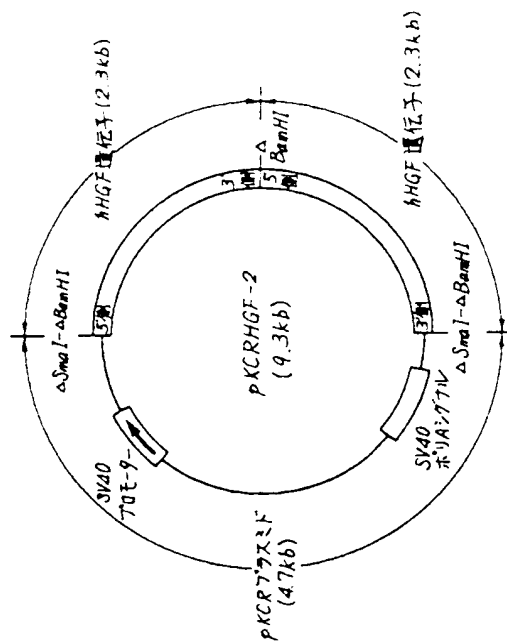
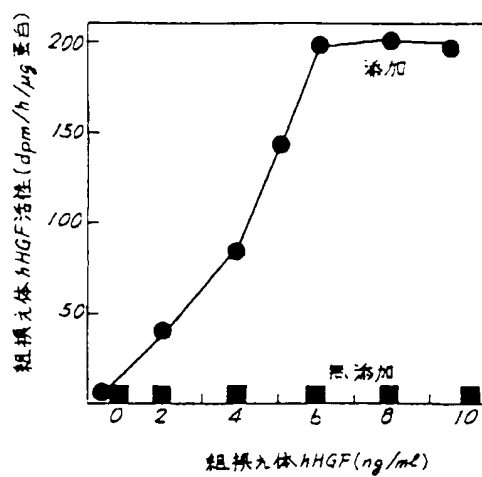


図 5 図



第1頁の続き

⑤Int. Cl. 3

識別記号

庁内整理番号

// C 12 N 15/12  
 (C 12 P 21/02  
 C 12 R 1:91)

ZNA

⑦発明者	芳山	美子	神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地	三菱化成株式会社 総合研究所内
⑦発明者	石井	健久	神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地	三菱化成株式会社 総合研究所内
⑦発明者	高橋	和展	神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地	三菱化成株式会社 総合研究所内